

**BIOPOLIMERO CON BASE EN LACTOCOCCUS LACTIS, NRRL B-30656, EL
PROCESO PARA EL CULTIVO DE LACTOCOCCUS LACTIS NRRL Y EL
PROCESO PARA LA PRODUCCION DEL BIOPOLIMERO**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención.

Esta invención se relaciona con un polímero de glucosa y fructosa y el método para su preparación utilizando una cepa de *Lactococcus lactis*. Los exopolisacáridos son polímeros naturales de glucosa y fructosa. Estos polímeros se encuentran en varias plantas y microorganismos y son de utilidad como emulsificantes, viscosantes y agentes de superficie en la industria de alimentos y medicamentos.

2. Descripción del estado del arte

Los fructanos ocurren naturalmente en dos formas generales que se diferencian por el tipo de unión entre las moléculas de fructosa: inulina, forma encontrada en plantas, está formado con una columna de moléculas de fructosa unidas por enlaces beta,2-1. Levanas, formadas como productos microbianos, tienen una columna de moléculas de fructosa unidas por enlaces beta,2-6. Los fructanos de plantas tienen menor tamaño (cerca de 100 residuos) mientras que las levanas microbianas contienen más de 3 millones de residuos (Pontis et al, 1985, Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. In: Dey and Dixon (eds). Ch. 5, p. 205. New York, Academic Press).

Las levanas microbianas son producidas con sustratos a base de sacarosa con una variedad de microorganismos: *Acetobacters* (Loewenberg, et al., 1957. Can. J. Microbiol., Vol. 3, p. 643); *Achromobacter sp.* (Lindberg, G., 1957. Nature. Vol. 180, p. 1141); *Aerobacter aerogenes* (Srinivasan, et al., 1958. Science. Vol.

127, p. 143); *Phytobacterium vitrosum* (Belval, et al., 1947. 1948. Compt. Rend.. Vol. 224, p. 847 y Vol. 226, , p. 1859); *Xanthomonas pruni*, (Cooper, et al., 1935. Biochem. J.. Vol. 29, p. 2267); *Bacillus subtilis* (Dedonder, R., 1966. Meth. Enzymol.. Vol. 8, , p. 500 y Tanka, et al., 1979. J. Biochem., Vol. 85, p. 287); *Bacillus polymyxa* (Hestrin et al., 1943. Biochem. J., Vol. 3, p. 450); *Aerobacter levanicum* (Hestrin, et al., Ibid.); *Streptococcus sp.* (Corrigen et al., 1979. Infect. Immun., Vol. 26, p. 387); *Pseudomonas sp.* (Fuchs, A. , 1956. Nature. Vol. 178, p. 92); *Corynebacterium laevaniformans* (Dias et al., 1962. Antonie Van Leewenhoek, Vol. 28, p. 63).

Existen algunos reportes de producción de levana a niveles muy bajos y de baja pureza para ser empleados industrialmente.

Otros polímeros biológicos tales como goma xantana y dextrana han sido extensamente empleados en la industria de alimentos como estabilizantes en emulsiones y espumas como helado, en aderezo de ensalada, etc. (Sharma, S.C., enero 1981. J. Food Tech., p. 59). Los polisacáridos extracelulares producidos por microorganismos ofrecen una variedad de usos y costos potencialmente bajos.

Generalmente se producen pequeñas cantidades de levana por fermentación de sacarosa empleando cepas de *Actinomyces viscosus* o *Aerobacter levanicum*.

Bacillus polymixa generalmente produce heteropolisacáridos con polímeros de diferentes formas. Cepas de *E. coli* genéticamente modificadas han sido empleadas para producir levana. (Gay, P. et al.. 1983. J. Bacteriol.. Vol. 153, p. 1424). Además, otros métodos empleando fermentación aeróbica han sido utilizados para la producción de levana (Jeanes, et al., U.S. Pat. No. 2,673,828; Gaffor, et al., U.S. Pat. No. 3,879,545; Ayerbe, et al., U.S. Pat. No. 4,399,221). Estos procesos tienen el inconveniente de producir bajo rendimiento del producto y problemas de contaminación, por lo cual se requieren procesos industriales que permitan una mayor productividad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El propósito principal de esta invención es proveer un biopolímero, producido por una enzima transferasa, la cual tiene actividad de transferencia para glucosa y fructosa, producida a partir de una cepa de *Lactococcus lactis*, NRRL B-30656, caracterizada por su alta actividad de transferencia, lo cual permite obtener el biopolímero mediante un método de producción sencillo y fácil de escalar. Su producción consiste en los siguientes pasos: **Fase 1:** Fermentación con la cepa de *Lactococcus lactis*, NRRL B-30656 en un medio de cultivo desarrollado para el crecimiento de este microorganismo. **Fase 2:** La recuperación de la enzima extracelular mediante centrifugación o ultrafiltración. **Fase 3.** La producción del biopolímero mediante la reacción enzimática utilizando sacarosa como sustrato y el extracto enzimático. **Fase 4:** La purificación del biopolímero mediante precipitación con solventes o ultrafiltración y posterior secado del producto.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El objeto de la invención es producir un biopolímero puro, libre de contaminantes polisacáridicos. El biopolímero se describe como un polímero producido por una cepa de *Lactococcus lactis* aislada del suelo. Esta cepa tiene alta actividad de transferencia, lo cual permite obtener el biopolímero mediante un proceso sencillo, y con una pureza mayor del 95%.

El microorganismo. En la presente invención la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, fue aislada del suelo mediante un proceso selectivo utilizando un medio que contenía sacarosa como fuente de carbono, en el cual, los microorganismos productores de enzimas transferasas son capaces de utilizar el sustrato y producir polímeros otorgando aspecto mucoide a la colonia. De este medio, son seleccionados los microorganismos con estas características y purificados mediante técnicas de aislamiento por diluciones sucesivas y

aislamiento en placa. De estas cepas se obtuvo la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 que se emplea en la presente invención.

En conformidad con esta invención, la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 ha sido depositada en el Banco de Referencia *AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE PATENT CULTURE COLLECTION NRRL*, institución que asignó el número de registro NRRL B-30656. Esta cepa produce una enzima que tiene actividad de transferencia de glucosa de 2-6 U/ml, empleando sacarosa como sustrato y produce un polímero de glucosa y fructosa con un peso molecular de 900-1100 KDaltons.

La cepa fue denominada NRRL B-30656. Esta cepa fue aislada y caracterizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). La cepa se conservó a 4°C en cajas de petri con medio de cultivo cuya composición es: sacarosa 10-40 g/l, extracto de levadura 7 - 30 g/l, fosfato de potasio 5-20 g/l 0.05-05 g/l, sales minerales 10-100 ppm, pH 5-9.

El microorganismo fue caracterizado por microscopía óptica utilizando tinción de Gram y microscopía electrónica de transmisión, utilizando tinción positiva con acetato de uranilo y citrato de plomo. La caracterización bioquímica se realizó con el sistema computarizado MicroScan y según lo descrito en el manual de bacteriología determinativa Bergey's (Stanley, W; Sharpe, E; Holt, J.. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William and Wilkins. Baltimore,)

El medio de cultivo. Para el diseño y optimización del medio de cultivo para la fermentación con la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, se realizó un balance entre la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y ciertos elementos traza. El medio de cultivo suministra al microorganismo los nutrientes que requiere para crecer y producir la enzima.

Como resultado de la evaluación de los componentes del medio de cultivo, se establecieron las siguientes concentraciones:

Componente	Concentración g/l
Sales	
K ₂ HPO ₄	7-30
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01-1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.01-0.1
MnSO ₄ . H ₂ O	0.001 – 0.1
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.001 – 0.01
NaCl	0.01-0.1
Fuente de Carbono	
Sacarosa	10-40
Fuente de Nitrógeno	
Extracto de levadura	7-30

El pH es ajustado a pH 5-9 con HCl. El medio se esteriliza a 121°C por quince minutos.

Fermentación. Los pre-inóculos corresponden al 5-20% del volumen del inóculo, son activados a partir de la cepa pura conservada a -70°C en medio con glicerol al 20%; el tiempo de incubación no supera las 10-36 horas, período en el cual se debe verificar la pureza del pre-inóculo. Estos cultivos se realizan en frascos de agitación, ocupando un 5-20% del volumen total e incubándolos a 20-40°C con agitación de 100-400 rpm en agitadores orbitales. De acuerdo con el número y tamaño de los fermentadores, se determina el número de inóculos necesarios.

Las condiciones de crecimiento, y producción de la enzima son: temperatura: 20-40°C, agitación: 100 – 400 rpm (dependiente de la escala de fermentación),

Aireación. El microorganismo que promueve la fermentación es aerobio, por lo cual el cultivo debe ser aireado con 0.1 –1 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y el pH se mantiene entre 5 y 9 durante la fermentación. Como resultado de este proceso productivo se tienen medios de cultivo con

combinaciones de componentes para alcanzar una concentración final entre 10-30 g/l de biomasa, peso húmedo, con una actividad de transferencia de 2-6 U/ml, la cual se logra en un tiempo de 6-24 horas.

Recuperación de la enzima. La enzima extracelular se recupera por centrifugación a 3.000 -10.000 rpm por 15 minutos o filtración para separar la biomasa. De este modo el extracto enzimático presenta una actividad de transferasa de 2-6 U/ml.

Producción del biopolímero

Reacción enzimática. Las condiciones de la reacción son las siguientes:

Medio de reacción:

Buffer fosfatos 50-300 Mm pH	: 5-9.
Sustrato	: sacarosa 5-40%.
Cantidad de enzima	: 10-40% v/v extracto enzimático.
Tiempo de reacción	: 12-48 horas
Agitación	: 100-400 rpm

Recuperación y purificación del biopolímero

Después de la reacción enzimática la temperatura se disminuye a 4°C y el biopolímero puede ser recuperado de dos formas:

a) Precipitación con solventes

A la mezcla de reacción fría se adiciona etanol al 96%, con agitación. La cantidad de etanol adicionada corresponde a 1.2- 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.

El biopolímero precipitado se redissuelve en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.2 - 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.

El biopolímero precipitado se redissuelve en un tercio del volumen de agua y se seca por liofilización o secado por aire forzado a 60°C, hasta una humedad del 5-6%.

b) Ultrafiltración

La mezcla de reacción se somete a un proceso de ultrafiltración en una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro mayor de 10.000 Daltons, con el fin de eliminar la glucosa y fructosa residuales. Posteriormente el biopolímero se somete a un proceso de secado por aspersión.

El biopolímero se caracteriza por cromatografía líquida de alta eficiencia y viscosidad de una solución al 10% a 30°C. El biopolímero presenta un tiempo de retención de 7 - 7.5 minutos empleando una columna Shodex SC1011, a una temperatura de 70°C, un flujo de 0.6 ml/min, y agua grado HPLC como fase móvil.

La viscosidad de una solución al 10% a 30°C, empleando un viscosímetro ViscoEasy, Serie L, Schott, Ref. 28.541.120, vástago L2, 50 rpm, se encuentra en un rango de 400-800 centipoises (cP).

El tamaño promedio de partícula "dvs" (diámetro / volumen / superficie) es de 224 micras. El biopolímero tiene una densidad verdadera cercana a la de sacarosa (1.5 mg/ml). Es un material que presenta una alta porosidad interparticular del 48%.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

EJEMPLO 1**Aislamiento e identificación del microorganismo productor de Biopolímero.**

Una bacteria productora de biopolímero fue aislada de suelo e identificada como *Lactococcus lactis* NRRL B-30656. Muestras de 10 g fueron recolectadas del suelo y crecidas en 100 ml de un medio líquido que contenía sacarosa como fuente de carbono, se incubó a 30°C con agitación por 24 horas. Obtenido el crecimiento se hacen 4 diluciones 1:10 en solución salina y la cuarta dilución se siembra. Este cultivo fue resembrado en medio sólido con la misma composición y se realizaron aislamientos seleccionando las colonias que presentaban producción de polímero. Después se transfirió el cultivo a medio fresco y se cultivó por 24 horas. Una vez aislado el microorganismo se conserva en un medio de sacarosa con glicerol al 20% a -70°C y por liofilización empleando leche descremada al 10%.

La cepa aislada, cultivada en medio sacarosa sólido, presentó las siguientes características macroscópicas: colonias circulares, de aspecto gomoso, borde definido y un diámetro aproximado de 2 a 3 mm (en 24 horas de cultivo) de color crema claro. A nivel microscópico y a través de una tinción de Gram, se observan cocos Gram positivos, se encuentran ocasionalmente de manera individual, generalmente se ven formando agrupaciones.

La caracterización por microscopía electrónica de transmisión permite observar células circulares en las que se puede diferenciar la pared celular, no se observan estructuras especiales como gránulos electrodensos, flagelos, fimbrias, etc.

La cepa de la presente invención es, *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, catalogada como microorganismo GRASS y presenta las siguientes características bioquímicas:

Prueba	Resultado
Crecimiento 10°C	Positivo
Crecimiento 15°C	Positivo
Crecimiento 42 °C	Negativo
Crecimiento pH 4.8	Positivo
Crecimiento pH 6.5	Positivo
Crecimiento pH 9.2	Dudoso
Crecimiento NaCl 0.5%	Positivo
Crecimiento NaCl 4%	Positivo
Crecimiento NaCl 5%	Positivo
Crecimiento NaCl 6.5%	Positivo
Crecimiento NaCl 10%	Negativo
Crecimiento NaCl 15%	Negativo
Catalasa	Negativa
Hemólisis	Gama

Motilidad	Negativa
Vogeess-Proskauer	Positivo
Glucosa aerobia	Positivo
Glucosa anaerobia	Positivo
Producción de Gas	Negativo
Lactosa aerobia	Positivo
Lactosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Fructosa aerobia	Positivo
Fructosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Maltosa aerobia	Positivo
Maltosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Manitol aerobio	Dudoso
Manitol anaerobio	Dudoso
Producción de gas	Negativo
Galactosa aerobia	Positivo
Galactosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Sacarosa aerobia	Positivo
Sacarosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Xilosa aerobia	Dudoso
Xilosa anaerobia	Dudoso
Producción de gas	Negativo
Rafinosa aerobia	Positivo
Rafinosa anaerobia	Positivo
Producción de gas	Negativo
Ribosa	Positivo
Trealosa	Positivo
Sorbitol	Positivo
Manosa	Positivo
Arabinosa	Positivo
Arginina	Positivo

EJEMPLO 2

PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA

1. Fermentación:

a) Activación del microorganismo

Para la obtención de la enzima transferasa se empleó el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656. La bacteria fue almacenada en una solución crioprotectora (glicerol) a -70°C. La cepa fue descongelada lentamente a temperatura ambiente y activada en 50 ml de medio sacarosa a una temperatura de 30°C por 12 horas, y 180 r.p.m. de agitación. Con 5 ml de este cultivo se realizaron dos tipos de siembras, la primera: en agar sacarosa, incubándose a 30°C por 24 horas, observándose las características mucoides, y almacenadas a 4°C; la segunda: en 100 ml de caldo sacarosa, incubándose a 30°C por 12 horas; este ultimo fue distribuido en tubos de centrifuga con una capacidad de 1 ml, con 20% V/V de glicerol y almacenados a -70°C utilizados para las posteriores fermentaciones. A los 45 ml del cultivo inicial restante, se conservaron en viales de 5 ml, mediante lyophilización, utilizando leche descremada estéril como soporte, en una concentración de 10% y almacenados a 4°C.

b) Preparación de preinóculos e inóculos

Se preparan preinóculos con la misma composición del medio correspondiente al lote; se toma el microorganismo conservado en medio sacarosa sólido, se siembra en un volumen de medio líquido, al 5-20% del volumen del inóculo, se cultivan a 25-35 °C, con agitación de 100-400 r.p.m durante 12-24 horas.

Composición del medio utilizado:

Componente	Concentración g/l
Sales:	

<chem>K2HPO4</chem>	10-20
<chem>FeSO4. 7H2O</chem>	0.03
<chem>MgSO4. 7H2O</chem>	0.02
<chem>MnSO4. H2O</chem>	0.002 – 0.1
<chem>CaCl2. 2 H2O</chem>	0.0015 – 0.015
<chem>NaCl</chem>	0.01-0.1
Fuente de Carbono:	
Sacarosa	15-30
Fuente de Nitrógeno:	
Extracto de levadura	15-30

El microorganismo se siembra al 5-10 % del volumen de fermentación y crece hasta una densidad óptica promedio de 0.7 u.a., en una dilución 1:10, leída a 600nm, se utiliza medio de cultivo estéril como blanco.

En la fermentación es necesario realizar preinóculo e inóculo dependiendo del volumen del fermentador en el cual se realice, de forma tal que en el inóculo final (10% del medio de cultivo depositado en el fermentador de producción) se obtenga la cantidad necesaria de células para evitar la fase de latencia en el reactor, tratando de conservar la relación de volumen de 1:10 entre el preinóculo y el inóculo precedente o suficiente densidad de células para servir de inoculo, manteniendo un riguroso control en la pureza y estado vegetativo del cultivo que se emplee como inóculo o preinóculo.

c) Preparación del medio de cultivo e inoculación.

El pH del medio de cultivo es ajustado a pH 7.0. El matraz con el medio para preparar el preinóculo es sometido a esterilización a 121°C por 15 minutos.

d) Condiciones de operación

La producción de ingrediente activo se realiza por fermentación en lotes utilizando el medio establecido. Las condiciones de operación se encuentran en la siguiente tabla:

Condiciones de operación de los fermentadores

Condiciones	14 l
Volumen de Medio (l)	10
Relación Volumen de Medio / Volumen del Fermentador.	0.8
Porcentaje de Inóculo	5-10
Densidad óptica de Inoculación	0.5-1
Agitación (r.p.m)	100-400
Temperatura (°C)	25-35
Aireación (v.v.m)	1-3
pH Inicial del medio	5-8
Tiempo de Fermentación (Horas)	6-12

2. Recuperación de la enzima:

a) Centrifugación.

La enzima extracelular se recupera por centrifugación a 5.000 rpm por 15 minutos para separar la biomasa. El extracto enzimático presenta una actividad de glucosiltransferara de 2 – 6 U/ml.

b) Ultrafiltración.

Otra manera de recuperar el sobrenadante de la fermentación es mediante el uso de membranas de ultra filtración con tamaños de poro 0.45-2 micras.

EJEMPLO 3

Producción y recuperación del Biopolímero.

a) Reacción enzimática. Las condiciones de la reacción son las siguientes:

Medio de reacción:

Buffer fosfatos 50-200 Mm pH	: 5 - 7
Sustrato	: sacarosa 8-20%.
Cantidad de enzima	: 10-30% v/v extracto enzimático (200-500U/l).
Tiempo de reacción	: 20-40 horas
Agitación	: 100-400 rpm

La enzima es separada por centrifugación, se coloca en un medio que contiene de 8-20% de sacarosa, a pH 5-8 y temperatura de 25-35°C, por 20-30 horas obteniendo una concentración de polímero de 30-60 g/l, correspondiente a 40-60% de rendimiento respecto al sustrato. En otros procesos reportados se requieren 5-10 días para la producción del polímero. Los microorganismos reportados producen concentraciones menores de polímero, tabla 1.

b) Purificación del biopolímero.

Después de la reacción enzimática la temperatura se disminuye a 4°C y el biopolímero puede ser recuperado de dos formas:

- **Precipitación con solventes.** A la mezcla de reacción fría se adiciona etanol al 96%, con agitación. La cantidad de etanol adicionada corresponde a 1.0-3.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- El biopolímero precipitado se redisuelve en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.0 a 3.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- El biopolímero precipitado se redisuelve en un tercio del volumen de agua y se seca por liofilización o secado por aire forzado a 60-80°C hasta una humedad del 5-10%.

TABLA 1**Producción de EPS por diferentes microorganismos.**

Organismo	Biopolímero (g/100 ml)
-----------	------------------------

<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
ATCC 11142	0
<i>B. polymyxa</i>	
NRRL B-68	0
NRRL B-130	0
NRRL B-510	1.2
NRRL B-4317	1.4
Isolate (NRRL B-18475)	3.6
<i>B. subtilis</i>	
NRRL B-447	1.0
NRRL B-577	0
NRRL B-644	0
NRRL B-675	1.0
NRRL B-744a	1.5
NRRL B-2612	0
<i>Enterobacter levanicum</i>	
NRRL B-1678	0.7
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	
ATCC 15953	1.2

➤ **Ultrafiltración.** La mezcla de reacción se somete a un proceso de ultrafiltración en una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro mayor de 10.000 Daltons, con el fin de eliminar la glucosa y fructosa residuales. Posteriormente el biopolímero se somete a un proceso de secado por aspersión.

La producción de biopolímero por este microorganismo depende de la concentración de sustrato y es óptima a 8-24%, donde se produce el biopolímero con mayor grado de pureza con el mayor rendimiento, tabla 2.

TABLA 2

Efecto de sacarosa sobre la producción de Biopolímero por *Lactococcus lactis*

Sacarosa, (%) Biopolímero (g/l)

Control	[0% (sin sacarosa)]
0	
Sacarosa, 8	38.8
Sacarosa, 12	50.1
Sacarosa, 16	55.6

c) Secado

El producto final obtenido es un polvo blanco, que puede ser secado por liofilización o por calor seco a una temperatura no mayor a 80°C.

EJEMPLO 4
Caracterización del Biopolímero

1. Solubilidad.

El producto es un biopolímero hidrosoluble capaz de formar dispersiones homogéneas tipo hidrogel hasta una concentración máxima de 50%. 1.0 g de biopolímero se disuelve en 32 ml de ácido clorhídrico al 5%, en 50 ml de hidróxido de sodio al 10%, en 30 ml de ácido acético glacial.

Es Insoluble en: etanol, isopropanol, acetona, aceite mineral, vegetal y polietilenglicol.

El producto es medianamente soluble en ácido oxálico al 0.5% a temperatura de ebullición.

2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

➤ En cromatografía de permeación una solución de biopolímero al 1.5% presenta un peso molecular de 900-1.100 KDa, determinado en una columna Shodex OHPak KB-803. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

Temperatura : 55°C
Fase Móvil : Solución de NaCl 0.1 M
Flujo : 0.9 ml/min

➤ La pureza del polímero es mayor al 95%, evidenciada por un pico delgado en HPLC bajo las siguientes condiciones:

Columna marca Shodex SC1011

Fase móvil : agua destilada desionizada.

Flujo : 0.6 ml/min.

Temperatura : 70°C.

Equipo : Waters 510 con detector de índice de refracción marca Waters 2410.

Bajo estas condiciones el biopolímero presenta un tiempo de retención de 7 a 7.5 minutos.

Los patrones utilizados fueron glucosa, fructosa, sacarosa y levana, grado reactivo analítico.

➤ El biopolímero es estable en un amplio rango de pH evidenciado por HPLC después de contacto del polímero con buffers de pH 2-9.

3. Viscosidad.

Se determinó la viscosidad de una solución al 10% a 30°C, empleando un viscosímetro ViscoEasy, Serie L, Schott, Ref. 28.541.120, vástago L2, 50 rpm, Las muestras analizadas presentaron una viscosidad en un rango de 1000-3000 centipoises (cP). Exhibe un comportamiento pseudo plástico (adelgazamiento al corte). La viscosidad de las soluciones del biopolímero disminuye al aumentar la velocidad de corte o cizalla, e incrementa al disminuir la temperatura.

4. Características dimensionales.

El biopolímero tiene una densidad verdadera cercana a la de sacarosa (1.5 mg/ml). Es un material que presenta una alta porosidad interparticular del 48%.

El tamaño promedio de partícula "dvs" (diámetro / volumen / superficie) es de 224 micras.

5. Adsorción de humedad

La capacidad de adsorción de agua oscila entre 6.12 mg/g y 353.20 mg/g dependiendo de la humedad relativa; esto lo hace un material ligeramente higroscópico. Gracias a su estructura polimérica e hidrofilidad, el biopolímero tiene la capacidad de esponjarse ilimitadamente al contacto con agua, siendo capaz de formar sistemas de consistencia variable dependiendo de la cantidad de agua incorporada, hasta dar lugar a la formación de dispersiones acuosas características por su alta viscosidad

6. Humedad

Presenta pérdidas por secado en estufa de vacío a 60° C no mayores del 10%.

7. Características térmicas

El biopolímero presenta dos puntos de transición vítrea; el primero entre 20 y 30°C y el segundo entre 190 y 220°C. Determinados mediante calorimetría diferencial de barrido.

8. Calidad microbiológica

El biopolímero presenta los siguientes recuentos microbiológicos:

Carga microbiológica	Rango	Unidad
Recuento de mesófilos viables.	2000 - 4000	ufc / gr
Recuento de coliformes.	Ausencia	nmp / gr
Recuento coliformes fecales.	<10	nmp / gr
Recuento de salmonella.	Ausencia	
Recuento de Mohos y levaduras.	2000 - 5000	ufc / gr

9. Usos.

- a) El biopolímero puede ser empleado en la Industria Farmacéutica como viscosante, espesante, estabilizante, dispersante, como formador de

películas, como desintegrante, como sustituto de plasma sanguíneo, como agente de lubricación como agente prebiótico.

- b) El biopolímero puede ser empleado en la Industria de Alimentos como espesante, viscosante, estabilizador, dispersante, como fibra y como sustituto de grasas, aceites y carbohidratos basados en éteres y ésteres.
- c) El biopolímero puede ser empleado en productos obtenidos por extrusión, para formar películas aptas para producir empaques flexibles y biodegradables y en la obtención de productos desechables biodegradables, obtenidos por inyección o por moldeo y en la producción de agentes floculantes para el tratamiento de aguas.

REIVINDICACIONES

Nosotros reclamamos

1. Un biopolímero de glucosa y fructosa obtenido a partir de productos del metabolismo de una cepa de *Lactococcus lactis* depositada bajo el código NRRL B-30656.. (nos parece importante que aparezca la información de la entidad depositaria de la cepa)
2. El biopolímero de la reivindicación 1 en donde los productos del metabolismo, consisten en enzimas con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa.
3. El biopolímero de que trata la Reivindicación 1, el cual tiene una composición que mantiene una relación glucosa/fructosa entre 0.2 y 0.7.
4. El biopolímero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual presenta las siguientes propiedades:
 - peso molecular 900-11000 Kilodaltons,
 - dos puntos de transición vítrea, el primero entre 20 y 30°C y el segundo entre 190 y 220°C,
 - estabilidad en soluciones acuosas con valores de pH entre 2 y 9,
 - viscosidad entre 1000 y 3000 centipoises cuando el polímero se encuentra en una concentración de 10 a 20% en una solución acuosa a temperatura de 30°C
 - no higroscópico.
 - altamente soluble en agua, capaz de formar dispersiones homogéneas tipo hidrogel hasta una concentración máxima de 50% peso /volumen.

5. Un método de producción de enzimas con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, producidas por la cepa de *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, que consiste en:

- a) Activar el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, empleando un medio que contiene azúcares como fuente de carbono, proteínas como fuente de nitrógeno y sales minerales.
- b) Fermentar el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene azúcares como fuente de carbono proteínas como fuente de nitrógeno y sales minerales.
- c) Separar la enzima a partir del medio fermentado empleando centrifugación o ultrafiltración.

6. El método de producción de la enzima de acuerdo la reivindicación 5, en donde la etapa de activar el microorganismo se lleva a cabo inoculando un medio que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas), proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, el cual se incuba por 10-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm y pH 5 a 9.

7. El método de la reivindicación 5 en donde la etapa de fermentar el microorganismo se lleva a cabo cultivando el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas), proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, el cual se incuba por 12-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm, 1-2 vvm y pH 5 a 9.

8. El método de la reivindicación 5 en donde la etapa de separar la enzima se lleva a cabo separando la enzima a partir del medio fermentado centrifugando la suspensión del microorganismo a 3000 a 7000 rpm o por ultracentrifugación, empleando una membrana de 0.22 a 0.45 micras.

9. El método de producción de la enzima, de acuerdo con la reivindicación 5 en donde en la etapa de fermentación con el microorganismo se puede llevar a cabo realizando un preinóculo con el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas), proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, el cual se incuba por 12-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm, 1-2 vvm y pH 5 a 9.

10. El método de producción de la enzima con actividad transferasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5 a 8, que consiste en:

- a. Activar el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656, inoculando un medio que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas) en concentraciones de 10-40 g/l, proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) concentraciones de 7 a 30 g/l y sales minerales: el cual se incuba por 10-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm y pH 5 a 9.
- b. Realizar un preinóculo con el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas), proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, el cual se incuba por 12-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm, 1-2 vvm y pH 5 a 9.
- c. Cultivar el microorganismo *Lactococcus lactis* NRRL B-30656 empleando un medio de cultivo que contiene azúcares como fuente de carbono (melaza, vinaza, sacarosa, y otras fuentes azucaradas), proteínas como fuente de nitrógeno (extracto de levadura, sulfato de amonio, extracto de carne y otras fuentes de nitrógeno) y sales minerales, K₂HPO₄,

FeSO₄. 7H₂O, MgSO₄. 7H₂O, MnSO₄. H₂O, CaCl₂. 2 H₂O, NaCl, el cual se incuba por 12-36 horas a 25°C, a 100-400 rpm, 1-2 vvm y pH 5 a 9.

d. Separar la enzima a partir del medio fermentado centrifugando la suspensión del microorganismo a 3000 a 7000 rpm o por ultracentrifugación, empleando una membrana con tamaño de poro entre 0.22 y 0.45 micras.

11. Un método de producción de un polímero de glucosa y fructosa de la reivindicación 1, que consiste en:

a) Incubar la enzima transferasa, obtenida por fermentación según la reivindicación 10, en un medio que contiene fuentes azucaradas, bajo condiciones adecuadas de agitación, temperatura, pH, concentración de enzima y sustrato y tiempo de reacción, para la producción del biopolímero.

b) Recuperar y purificar el biopolímero por precipitación o ultrafiltración.

12. El método de producción del biopolímero, de acuerdo con la Reivindicación 10, en donde la etapa de incubar la enzima consiste en:

Incubar la enzima en un medio que contiene fuentes azucaradas (vinazas, melazas, sacarosa), bajo condiciones adecuadas de agitación (100-400 rpm), temperatura, pH (5 a 9), concentración de enzima(10-40% v/v extracto enzimático) y sustrato (5-40%) y tiempo de reacción (12-48 horas), para la producción del biopolímero.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la etapa de recuperar y purificar el biopolímero por precipitación consiste en:

- Adicionar a la mezcla de reacción fría 1.2-2.0 volúmenes de etanol al 96%, con agitación (la cantidad de etanol adicionada corresponde a de etanol/volumen de mezcla de reacción).

- Disolver el biopolímero precipitado en la mitad del volumen de agua desionizada y destilada y se precipita nuevamente con 1.2 a 2.0 volúmenes de etanol/volumen de mezcla de reacción.
- Disolver el biopolímero precipitado en un tercio del volumen de agua y secar por liofilización o secado por aire forzado de 50 a 80°C hasta una humedad del 5-6%.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en donde la etapa de recuperar y purificar el biopolímero por ultrafiltración consiste en: realizar un proceso de ultrafiltración con la mezcla de reacción empleando una membrana de celulosa regenerada con un tamaño de poro mayor de 10.000- 30.000 Dalton, con el fin de eliminar la glucosa y fructosa residuales, y someter el biopolímero a un proceso de secado por aspersión.

15. Un microorganismo de la cepa de *Lactococcus lactis*, aislado de suelos colombianos, depositado bajo el código NRRL B-30656.

16. Un microorganismo descrito en la reivindicación 14, el cual produce enzimas con dos tipos de actividad glucosiltransferasa y fructosiltransferasa.

17. Un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 14 utilizado para producir el biopolímero mencionado en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4.

18. Un método para la conservación del microorganismo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que consiste en la liofilización del microorganismo que comprende las etapas de:

- a) Cultivar el microorganismo en caldo sacarosa a 25-35°C por 12-24 horas.

b) Distribuir el cultivo en tubos de centrífuga con una capacidad de 1 ml, con 10 a 20% v/v de leche descremada estéril.

c) Liofilizar el cultivo.

19. Un método para la conservación del microorganismo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que consiste en la congelación del microorganismo que comprende las etapas de:

a) Cultivar el microorganismo en caldo sacarosa a 25-35°C por 12-24 horas.

b) Distribuir el cultivo en tubos de centrífuga con una capacidad de 1 ml, con 20% v/v de glicerol y almacenar a -70°C.

20. El biopolímero de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual se utiliza en la Industria Farmacéutica como viscosante, espesante, estabilizante, dispersante, formador de películas, desintegrante, sustituto de plasma sanguíneo, agente de lubricación y agente prebiótico.

21. El biopolímero de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual se utiliza en la Industria de Alimentos espesante, viscosante, estabilizador, dispersante, fibra y sustituto de grasas, aceites y carbohidratos basados en éteres y ésteres.

22. El biopolímero de acuerdo con la cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, el cual se utiliza en productos obtenidos por extrusión, para formar películas aptas para producir empaques flexibles y biodegradables y en la obtención de productos desechables biodegradables, obtenidos por inyección o por moldeo y en la producción de agentes floculantes para el tratamiento de aguas.